

КЛИНИКО-ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

©Коллектив авторов

ЛИПИДОМНЫЙ АНАЛИЗ МОЛЕКУЛЯРНЫХ ВИДОВ ГЛИЦЕРОФОСФАТИДИЛЭТАНОЛАМИНОВ У ПАЦИЕНТОВ С БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ, ОТЯГОЩЁННОЙ ОЖИРЕНИЕМ

Ю.К. Денисенко¹, У.М. Оматова^{1*}, Т.П. Новгородцева¹, Е.В. Ермоленко²

¹Владивостокский филиал Дальневосточного научного центра физиологии и патологии дыхания — Научно-исследовательский институт медицинской климатологии и восстановительного лечения, 690105, Владивосток, ул. Русская, 73г; *эл. почта: omatova.um@inbox.ru

²Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского Дальневосточного отделения РАН, 690041, Владивосток, ул. Пальчевского, 17

Бронхиальная астма (БА), отягощённая ожирением, представляет собой фенотип прогрессирующего заболевания, который трудно поддаётся стандартной терапии. В связи с этим детализация клеточно-молекулярных механизмов развития данной коморбидной патологии является актуальным направлением современных исследований. В последние годы активным исследовательским инструментом стала липидомика, открывающая ряд возможностей не только для понимания клеточных процессов в норме и патологии, но и для обеспечения персонализированного подхода в медицине. Цель исследования — охарактеризовать особенности липидома фенотипа БА, отягощённой ожирением, на основе исследования молекулярных видов глицерофосфатидилэтанолламинов (ГФЭ) плазмы крови у пациентов с данной коморбидной патологией. В образцах крови 11 пациентов исследованы молекулярные виды ГФЭ. Идентификацию и количественное определение ГФЭ проводили с использованием tandemной масс-спектрометрии высокого разрешения. Впервые при данной патологии показано изменение липидного профиля молекулярных видов диацильных, алкил-ацильных и алкенил-ацильных ГФЭ плазмы крови. При БА, отягощённой ожирением, в молекулярном составе диацильфосфатидилэтанолламинов преобладают ацильные группы 18:2 и 20:4 в позиции sn2. Одновременно с повышением уровня диацильных ГФЭ с 20:4, 22:4 и 18:2 ЖК происходит уменьшение данных ЖК в алкильных и алкенильных молекулярных видах ГФЭ, что свидетельствует об их перераспределении между субклассами. Дефицит эйкозапентаеновой кислоты (20:5) в положении sn2 алкенил ГФЭ при БА, отягощённой ожирением, указывает на снижение субстрата для синтеза противовоспалительных медиаторов. Итоговый дисбаланс в процентном распределении субклассов ГФЭ, обусловленный выраженным увеличением содержания диацильных ГФЭ на фоне дефицита молекулярных видов этерных форм, вероятно, может вызывать хронизацию воспаления и развитие окислительного стресса. Установленный липидомный профиль в виде модификации основного состава и химической структуры молекулярных видов ГФЭ при БА, отягощённой ожирением, свидетельствует об их важном участии в патогенетических механизмах развития БА. Раскрытие конкретной роли отдельных субклассов глицерофосфолипидов и их индивидуальных представителей может способствовать выявлению новых терапевтических мишеней и биомаркеров бронхолегочной патологии.

Ключевые слова: глицерофосфатидилэтанолламины; этерные липиды; бронхиальная астма; ожирение; хронические респираторные заболевания; плазма

DOI: 10.18097/PBMC20236903174

ВВЕДЕНИЕ

Фенотип бронхиальной астмы (БА), отягощённой ожирением, относится к глобальной проблеме общественного здравоохранения. Известно, что многие метаболические расстройства, такие как сахарный диабет, сердечно-сосудистые заболевания, метаболический синдром, связаны с дефектами метаболизма липидов [1]. Фенотип БА, отягощённой ожирением, относится не только к категории хронических воспалительных заболеваний органов дыхания, но и к более широкому понятию общего нарушения метаболизма. Избыточное накопление липидов в жировой ткани и печени нарушает баланс между синтезом, деградацией, окислением и переэтерификацией липидных молекул, что в итоге влияет на иммунные, антиоксидантные, гормональные процессы [2]. Точные клеточно-молекулярные и генетические механизмы развития фенотипа БА, отягощённой ожирением, остаются неясными и, вероятно, являются многофакторными.

Липидомика, включающая определение молекулярной структуры сложных и простых липидов, приобретает большую популярность в расшифровке патофизиологических механизмов различных заболеваний [3]. Идентификация отдельных молекулярных видов липидов при БА может стать надежным инструментом для установления патогенеза этого заболевания, выделения биомаркеров и разработки персонализированного подхода в терапии.

На сегодняшний день известно 8 основных классов липидов, среди которых глицерофосфолипиды (ГФЛ) выполняют строительную, энергетическую и сигнальную функции [3]. Глицерофосфатидилэтанолламин (ГФЭ) является вторым по распространённости глицерофосфолипидом (после глицерофосфатидилхолина) в биологических мембранах. ГФЭ — многофункциональный липид, необходимый для многих эссенциальных процессов в клетке. Он играет существенную роль в аутофагии, клеточном делении и фолдинге белков. Кроме того,

ГФЭ — важный промежуточный продукт в синтезе других классов глицерофосфолипидов в цикле Кеннеди [4, 5]. Он влияет на топологию мембран и способствует слиянию мембран клеток и органелл, окислительному фосфорилированию, митохондриальному биогенезу [6, 7]. Показана ассоциация нарушения метаболизма ГФЭ с развитием болезни Альцгеймера, болезни Паркинсона, неалкогольной болезни печени [8, 9].

В организме человека ГФЭ представлены широким разнообразием молекулярных видов, которое достигается благодаря многочисленным комбинациям видов жирных кислот (ЖК) и способов соединения жирнокислотных цепей с глицериновой основой.

ГФЭ с алкенильной связью являются важными структурными и сигнальными компонентами мембраны клетки и сурфактанта лёгких, обладают противовоспалительными, антиоксидантными свойствами. Показано, что алкенил ГФЭ, содержащие остаток 20:4 (арахидоновой) ЖК в положении sn2, снижают свободнорадикальные процессы, что защищает мембрану клеток от окислительного повреждения [8].

Несмотря на очевидную высокую значимость ГФЭ в клеточных процессах организма, нет исследований, касающихся расшифровки молекулярного состава ГФЭ при БА, отягощённой ожирением. Применение современных методов липидомики для выявления особенностей состава и распределения молекулярных видов отдельных классов глицерофосфолипидов при БА, отягощённой ожирением, поможет расшифровать молекулярные механизмы патогенеза данного заболевания.

Цель работы — изучить молекулярные виды глицерофосфатидилэтаноламинов плазмы крови у пациентов с БА и БА, отягощённой ожирением, и выявить молекулярные особенности липидома фенотипа БА, отягощённой ожирением.

МЕТОДИКА

Исследование проведено на базе Владивостокского филиала Дальневосточного научного центра физиологии и патологии дыхания (ДНЦ ФПД) — Научно-исследовательского института медицинской климатологии и восстановительного лечения.

В исследовании использовали плазму крови 16 человек: 11 пациентов с БА лёгкой степени тяжести контролируемого и частично контролируемого течения (средний возраст $52,6 \pm 9,8$ лет), из которых 5 пациентов имели алиментарно-конституционное ожирение I-II степени, и 5 здоровых добровольцев (средний возраст $37,6 \pm 5,9$ лет). БА диагностировали в соответствии с критериями Глобальной стратегии лечения и профилактики бронхиальной астмы (GINA, 2019) и МКБ-10. Алиментарно-конституционное ожирение диагностировали согласно рекомендациям ВОЗ (2004). Пациенты с БА получали медикаментозную ингаляционную терапию в виде комбинированного препарата (будесонид/формотерол 160/4,5 мкг, 2 дозы в сутки). Критериями включения в контрольную группу добровольцев, подходящих под определение “условно здоровые”, были: отсутствие

респираторной патологии, хронической инфекционной и неинфекционной патологии, декомпенсированных состояний, с отрицательным аллергологическим анамнезом, неотягощённой по БА и другим аллергическим заболеваниям наследственностью.

При общем клиническом исследовании анализировали жалобы пациентов, анамнез заболевания и жизни, результаты опроса с целью выявления факторов риска развития респираторной патологии и данные физикального обследования. Учитывали давность заболевания БА, анамнез и давность ожирения, наличие или отсутствие признаков атопии, триггеры, вызывающие ухудшение состояния, факт и стаж табакокурения, воздействие промышленных поллютантов.

Измеряли антропометрические показатели: рост, вес, окружности талии (ОТ) и обхват бёдер (ОБ). Индекс Кетле (ИК) рассчитывали по формуле: $ИК (кг/м^2) = \text{масса тела (кг)} / \text{рост (м)}^2$. Нормальной массе тела (НМТ) соответствовал ИК от 18,9 кг/м² до 24,9 кг/м², избыточной массе тела (ИМТ) — ИК от 25 кг/м² до 29,9 кг/м², ожирению I степени — ИК от 30 кг/м² до 34,9 кг/м², ожирению II степени — ИК от 35 кг/м² до 39,9 кг/м².

Для оценки текущего клинического контроля БА использовали национальные клинические рекомендации и GINA 2019 г. Для количественной оценки уровня контроля БА применяли опросник ACQ-5 (Asthma Control Questionnaire). Контролируемому и частично контролируемому течению БА соответствовали значения до 0,75, риску обострений — от 0,75 до 1,5, неконтролируемой БА — выше 1,5.

Анализ молекулярных видов ГФЛ проводили после их предварительной экстракции классическим методом Bligh и Dyer [11] с модификациями [12, 13]. Точность определения массы при идентификации липидов была в диапазоне от 2 ppm до 7 ppm. Для экстракции брали 0,5 мл образца плазмы крови. Использовали системы химически чистых растворителей хлороформ-метанол 1:2 (по объёму), затем 1:1 (по объёму), разделяли фазы 0,9% раствором хлорида натрия. Разделение липидного экстракта проводили на колонке Shim-Pack UC-X Diol (2,1×150 мм, размер частиц 3 мкм) (“Shimadzu”, Япония) в градиентной системе элюирования. Система А: *n*-гексан/2-пропанол/H₂O/HCOOH/NH₄OH/Et₃N (72:28:1,5:0,1:0,05:0,02; по объёму), система Б: 2-пропанол/H₂O/HCOOH/NH₄OH/Et₃N (100:1,5:0,1:0,05:0,02; по объёму). Программа элюирования: 0% Б (8 мин), от 0% до 20% Б (7 мин), от 20% до 100% Б (5 мин), 100% Б (15 мин), от 100% до 0% Б (0,1 мин), 0% Б (10 мин). Скорость потока составляла 0,2 мл/мин. Образцы вводили в объёме 2 мкл. Время элюирования фосфатидилэтаноламинов составило 4–6 мин.

Молекулярные виды ГФЭ анализировали на тандемном масс-спектрометре высокого разрешения LCMS-IT-TOF (“Shimadzu”). Регистрацию ионов осуществляли в пределах 200–1500 *m/z* в режиме ионизации электрораспылением при одновременной регистрации положительных и отрицательных ионов.

Температура ионного источника составляла 200°C, давление газа-осушителя (азот) — 140 кПа, поток газа-распылителя (азот) — 1,5 л/мин. Фрагментацию при tandemной масс-спектрометрии осуществляли в автоматическом режиме при окне изоляции иона-прекурсора 400–1000 m/z . В качестве газа для соударения использовали аргон под давлением 0,003 Па (50% от объёма). Характеристические ионы для молекулярных видов классов фосфатидилэтаноламинов приведены Imbs и соавт. [14]. Идентификацию молекулярных видов осуществляли на основании полученных масс-спектров при фрагментации молекул фосфолипидов. Хромограмма общих липидов и масс-спектры ГФЭ приведены на рисунке 1.

Статистическую обработку полученных результатов осуществляли в программе Statistica 6.1. Количественные значения представлены в виде медианы (Me) и интерквартильного интервала (Q1 и Q3), где Q1 — 25-й процентиль, Q3 — 75-й процентиль. Данные оценивали с помощью критерия Краскела-Уоллиса. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

При обнаружении различий проводили попарные сравнения для выявления новых критических уровней значимости. Для апостериорного сравнения использовали критерий Манна-Уитни. В случае сравнения более двух групп использовали поправку Бонферрони, где уровень значимости p/k (k — число сравнений). Критический уровень значимости при сравнении трёх групп: $p = 0,017$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Методом хроматомасс-спектрометрии впервые было идентифицировано 45 молекулярных видов ГФЭ в плазме крови пациентов с БА, отягощённой ожирением (рис. 2). Молекулярные формулы и число двойных связей в молекулах ГФЭ были установлены на основании определения отношения m/z депротонированных ионов с точностью от 2 ppm до 7 ppm.

Липидомный профиль диацильных форм фосфатидилэтаноламинов и их процентное содержание в плазме крови исследуемых групп приведены в таблице 1. Идентифицировано 15 молекулярных

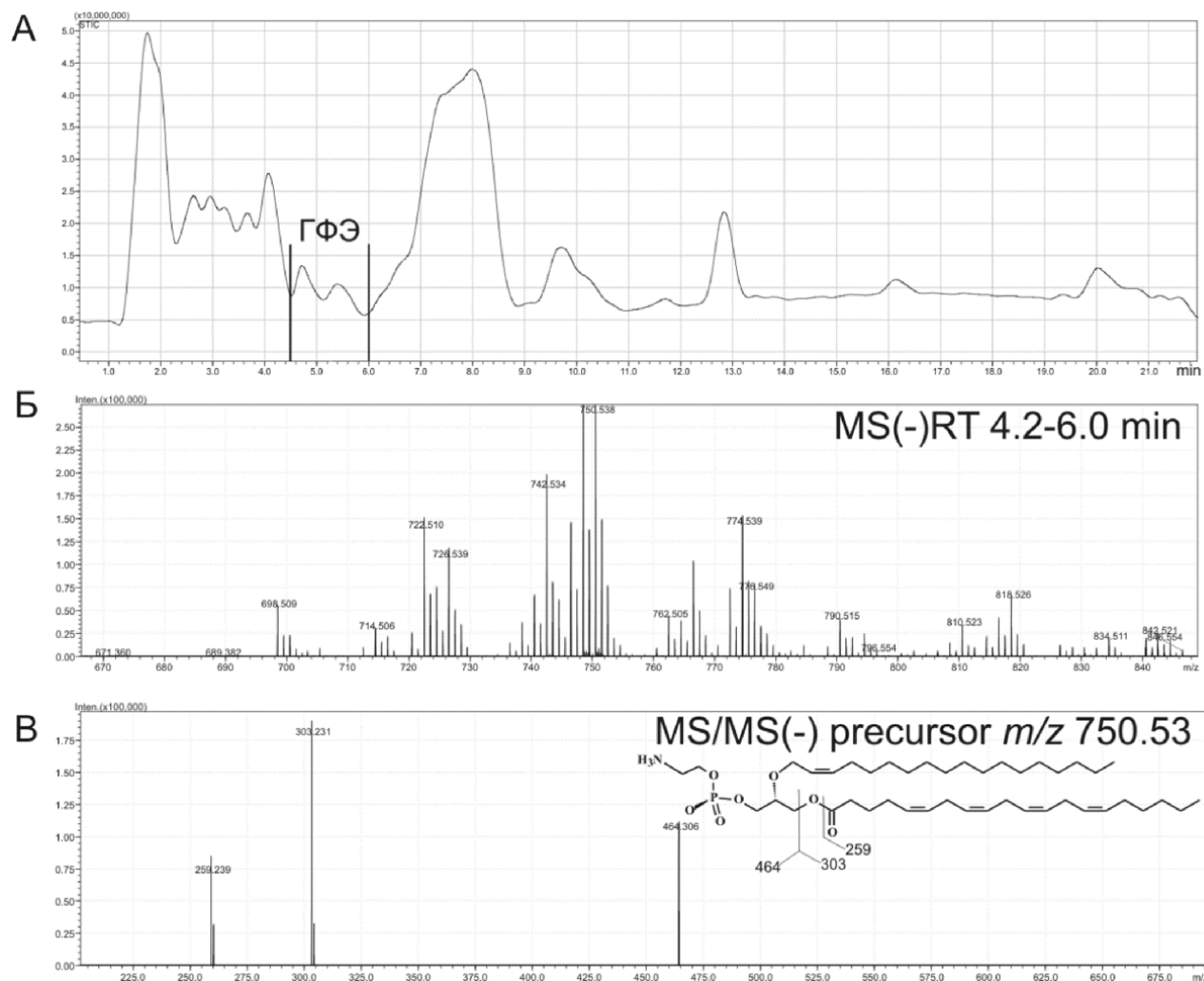


Рисунок 1. Хромограмма общих липидов и масс-спектры ГФЭ. (А) Общие липиды плазмы (проанализированы с использованием нормально-фазовой жидкостной хроматографии – tandemной масс-спектрометрии высокого разрешения в режиме ионизации распыление в электрическом поле. (Б) Масс-спектры для липидов, элюирующих между 4,2-6,0 мин. (В) Масс-спектр МС/МС прекурсора 750,53 m/z и схема фрагментации ГФЭ P-18:0_20:4.

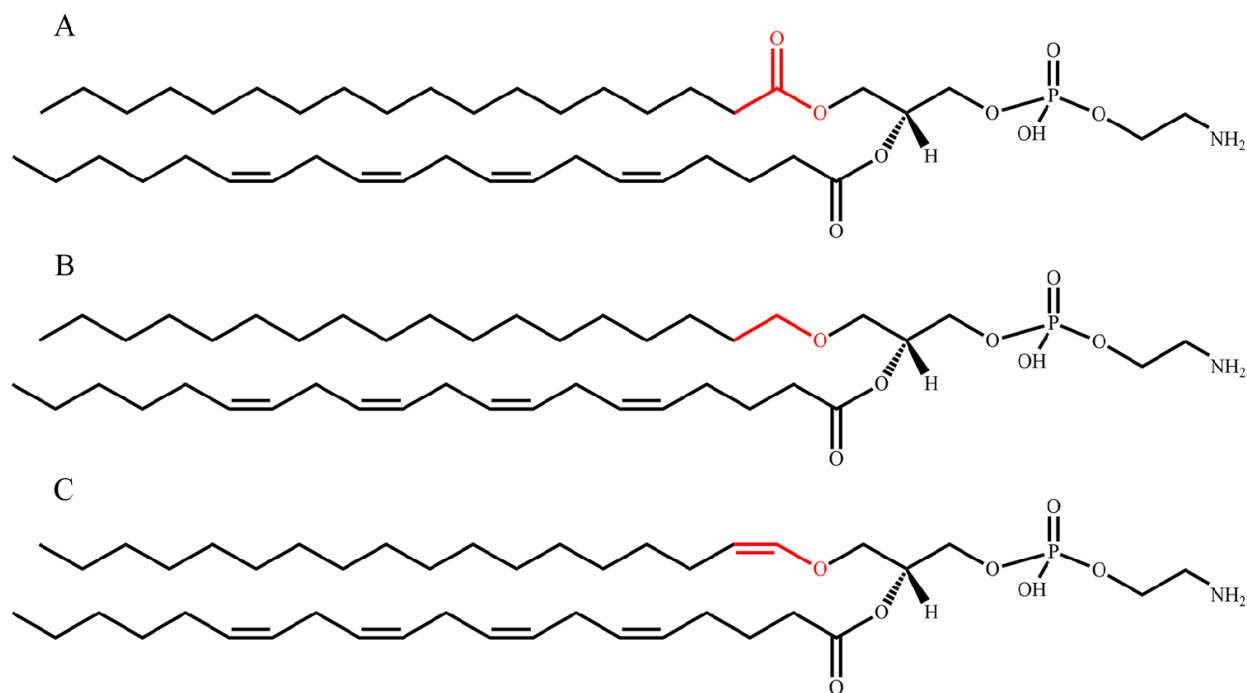


Рисунок 2. Молекулярные виды диацил, алкил-ацил и алкенил-ацил субклассов на примере 18:0_20:4 ГФЭ. (А) 1-октадеканоил-2-(5Z,8Z,11Z,14Z-эйкозатетраоил)-глицеро-3-фосфоэтаноламин или ГФЭ (18:0_20:4(5Z,8Z,11Z,14Z)). (Б) 1-октадецил-2-(5Z,8Z,11Z,14Z-эйкозатетраоил)-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин или ГФЭ (О-18:0_20:4(5Z,8Z,11Z,14Z)). (В) 1-(1Z-октадеценил)-2-(5Z,8Z,11Z,14Z-эйкозатетраоил)-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин или ГФЭ (P-18:0_20:4(5Z,8Z,11Z,14Z)).

Таблица 1. Профиль молекулярных видов диацил фосфатидилэтаноламинов плазмы крови пациентов с бронхиальной астмой

sn1_sn2	Контроль, %	БА при нормальной массе тела, %	БА, отягощённая ожирением, %
16:0_18:1	0,81 (0,79–0,81)	*1,14 (1,05–1,17)	*1,09 (1,06–1,15)
16:0_18:2	0,97 (0,75–0,99)	1,24 (0,98–1,40)	*1,54 (1,28–1,69)
16:0_20:4	1,41 (1,28–1,42)	*2,34 (2,22–2,88)	*2,49 (2,22–2,71)
16:0_22:6	1,79 (1,74–1,80)	1,80 (1,71–1,84)	* 2,43 (2,36–2,45)
18:0_18:1	0,90 (0,84–0,91)	1,00 (0,87–1,27)	0,98 (0,92–1,02)
18:0_18:2	3,71 (3,45–3,99)	*6,35 (5,62–7,18)	*7,04 (6,92–7,27)
18:0_20:3	0,29 (0,28–0,31)	*0,42 (0,36–0,48)	*0,48 (0,45–0,48)
18:0_20:4	5,06 (5,04–5,64)	*7,52 (7,09–8,24)	*8,82 (7,58–8,98)
18:0_20:5	0,31 (0,29–0,31)	0,23 (0,21–0,28)	0,29 (0,28–0,30)
18:0_22:4	0,10 (0,09–0,11)	*0,13 (0,12–0,15)	*0,25 (0,21–0,26)*
18:0_22:5	0,16 (0,15–0,17)	0,19 (0,18–0,21)	*0,21 (0,20–0,21)
18:0_22:6	1,05 (1,05–1,19)	*1,49 (1,41–1,59)	1,26 (1,14–1,29)
18:1_18:2	0,67 (0,65–0,68)	0,62 (0,58–0,67)	*1,02 (0,92–1,05)*
18:1_20:4	0,69 (0,68–0,71)	0,77 (0,71–0,85)	*0,98 (0,92–1,01)
18:1_22:6	0,15 (0,14–0,15)	*0,19 (0,18–0,24)	*0,17 (0,16–0,17)
sum sn2_20:4	7,16 (6,87–7,63)	*10,67 (10,01–12,49)	*11,42 (10,90–12,37)
sum sn2_18:2	5,07 (4,85–5,63)	*8,58 (7,79–8,78)	*9,73 (9,18–9,85)
sum диацил ГФЭ	18,09 (17,93–19,02)	*26,49 (25,46–27,50)	*28,95 (28,35–29,18)*

Примечание. Количественные значения представлены в виде медианы (Me) и интерквартильного интервала (Q25–Q75). Относительное содержание каждого молекулярного вида приведено в % от суммы всех молекулярных видов фосфатидилэтаноламинов; sn1 – ацильный заместитель в первом положении, sn2 – ацильный заместитель во втором положении. Звёздочками справа обозначены статистически значимые различия между фенотипами бронхиальной астмы, слева – относительно группы контроля: (*) – $p < 0,017$.

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ВИДЫ ГФЭ ПРИ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЕ С ОЖИРЕНИЕМ

видов 1,2-диацил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламинов. У больных БА независимо от массы тела были повышены следующие молекулярные виды диацил ГФЭ: 16:0_18:1, 16:0_20:4, 18:0_18:2, 18:0_20:3, 18:0_20:4, 18:0_22:4. По сравнению с группой контроля уровень 18:0_20:4 диацил ГФЭ (рис. 2) у пациентов с БА был выше на 49%, у пациентов с БА, отягощённой ожирением, — на 74%; 18:0_18:2 диацил ГФЭ — на 71% и 90%; 16:0_20:4 диацил ГФЭ — на 40% и 43%; 16:0_18:1 диацил ГФЭ — на 66% и 76%; 18:0_20:3 диацил ГФЭ — на 30% и 40%; 18:0_22:4 диацил ГФЭ — на 43% и 66% соответственно. В группе пациентов с БА, отягощённой ожирением, содержание 16:0_22:6 диацил ГФЭ было повышено на 35%, 18:1_18:2 диацил ГФЭ — на 65%, 18:0_22:4 диацил ГФЭ — на 92% по сравнению с группой пациентов с БА и нормальной массой тела.

Проведённый анализ показал, что плазма крови пациентов с БА содержала повышенный уровень молекулярных видов диацил ГФЭ с 20:4 в позиции sn2. Суммарный состав данных диацил ГФЭ был выше на 49% и 60% соответственно у пациентов с БА и БА, отягощённой ожирением, по сравнению с группой

контроля, при этом между фенотипами БА отсутствовали значимые различия. Полученные результаты указывают на преобладание молекулярных видов фосфолипидов, богатых арахидоновой кислотой (20:4) в плазме крови пациентов с БА. Суммарный показатель молекулярных видов диацил ГФЭ, эстерифицированных ацильным фрагментом 18:2 в положении sn2, также превышал значения группы контроля — на 69% в группе пациентов с БА и на 92% в группе пациентов с БА, отягощённой ожирением.

Анализ химической структуры и содержания молекулярных видов 1-О-алкил-2-ацил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламинов (О-ГФЭ, плазманил ГФЭ или алкил ГФЭ) в плазме крови исследуемых групп выявил, что при БА независимо от массы тела снижается уровень 18:1_20:5 и 18:2_20:5 алкил ГФЭ (табл. 2). Показано, что плазма крови у всех пациентов с БА содержала пониженный уровень молекулярных видов, несущих фрагмент эйкозопентаеновой кислоты (20:5) в позиции sn2. Совокупность представленных молекулярных видов алкил фосфатидилэтаноламинов была значимо ниже на 16% и 21% соответственно в группах пациентов с БА

Таблица 2. Профиль молекулярных видов алкил-ацильных фосфатидилэтаноламинов плазмы крови пациентов с бронхиальной астмой

sn1_sn2	Контроль, %	БА при нормальной массе тела, %	БА, отягощённая ожирением, %
O-16:1_18:1	0,68 (0,67–0,72)	0,64 (0,62–0,78)	0,85 (0,85–0,89)
O-16:1_18:2	1,49 (1,36–1,60)	1,54 (1,41–1,75)	1,54 (1,40–1,61)
O-16:1_20:4	5,22 (4,65–5,79)	4,65 (4,52–5,05)	4,36 (4,01–4,57)
O-16:1_20:5	0,30 (0,25–0,35)	0,26 (0,24–0,29)	0,31 (0,26–0,31)
O-16:1_22:6	2,52 (2,32–2,87)	2,68 (1,96–2,94)	2,51 (2,50–2,73)
O-18:0_20:4	0,55 (0,49–0,56)	0,42 (0,39–0,46)	0,69 (0,64–0,75)*
O-18:1_18:1	0,74 (0,74–0,79)	0,80 (0,70–0,81)	0,72 (0,65–0,81)
O-18:1_18:2	3,13 (3,03–3,93)	3,15 (2,48–3,43)	2,99 (2,95–3,47)
O-18:1_20:3	1,01 (0,99–1,25)	1,03 (0,95–1,19)	1,04 (1,01–1,15)
O-18:1_20:4	6,53 (6,50–7,04)	6,13 (5,92–6,88)	5,40 (5,24–5,99)
O-18:1_20:5	0,78 (0,63–0,80)	*0,56 (0,46–0,62)	*0,52 (0,49–0,53)
O-18:1_22:5	1,39 (1,27–1,43)	1,29 (1,25–1,33)	1,37 (1,18–1,40)
O-18:1_22:6	2,12 (2,07–2,34)	2,19 (1,94–2,64)	2,14 (2,01–2,36)
O-18:2_18:2	2,00 (1,80–2,05)	1,80 (1,46–1,85)	1,62 (1,61–1,64)
O-18:2_20:4	5,94 (5,87–6,30)	5,58 (5,23–5,62)	5,65 (5,13–5,78)
O-18:2_20:5	0,80 (0,78–0,81)	*0,64 (0,62–0,67)	*0,62 (0,60–0,63)
O-18:2_22:6	2,38 (2,36–2,39)	2,04 (1,56–2,60)	1,85 (1,72–2,54)
O-20:1_18:2	0,28 (0,25–0,31)	0,32 (0,30–0,32)	0,30 (0,30–0,31)
O-20:1_20:4	0,30 (0,29–0,31)	0,26 (0,25–0,29)	0,27 (0,26–0,35)
sum алкил ГФЭ	38,92 (36,97–39,35)	36,46 (34,34–38,61)	*35,46 (34,72–36,36)
sum sn2_20:4	18,83 (15,86–20,13)	17,58 (16,27–18,46)	16,95 (15,35–16,96)
sum sn2_20:5	1,77 (1,51–2,05)	*1,48 (1,39–1,52)	*1,40 (1,34–1,61)
sum sn2_22:6	7,11 (6,58–7,70)	7,00 (5,26–8,25)	6,68 (6,40–7,72)

Примечание. Количественные значения представлены в виде медианы (Me) и интерквартильного интервала (Q25–Q75). Относительное содержание каждого молекулярного вида приведено в % от суммы всех молекулярных видов фосфатидилэтаноламинов; sn1 – алкильный заместитель в первой позиции, sn2 – ацильный заместитель во второй позиции. Звёздочками справа обозначены статистически значимые различия между фенотипами бронхиальной астмы, слева – относительно группы контроля: (*) – $p < 0,017$.

и БА, отягощённой ожирением, по сравнению с группой контроля. Снижение уровня ГФЭ, несущих в положении sn2 20:5, и общее повышение эстерификации арахидоновой кислотой (20:4) указывает на перераспределение жирных кислот в сторону снижения противовоспалительных медиаторов и увеличения провоспалительных.

В обеих группах пациентов с БА молекулярные виды алкил ГФЭ, содержащие ацильные фрагменты 20:4 (16:1_20:4, 18:0_20:4, 18:1_20:4, 18:2_20:4, 20:1_20:4) и 22:6 в положении sn2 (16:1_22:6, 18:1_22:6, 18:2_22:6) преобладали над другими видами ацильных остатков. Суммарное значение относительного содержания ацильного остатка 20:4 в молекулярных видах алкил ГФЭ составило 18,83% в контрольной группе, 17,58% в группе пациентов с БА и нормальной массой тела и 16,95% в группе пациентов с БА, отягощённой ожирением. Сумма молекулярных видов 1-О-алкил-2-ацил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламинов, содержащих фрагмент 22:6 в положении sn2, составила 7,11%, 7,00% и 6,68% в исследуемых группах соответственно.

Использование tandemной масс-спектрометрии позволило провести идентификацию 11 молекулярных видов 1-О-алкенил-2-ацил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламинов (Р-ГФЭ, алкенил ГФЭ, плазмил ГФЭ) в плазме крови исследуемых групп (табл. 3). Алкенильные фосфатидилэтаноламины в позиции sn1 были представлены фрагментами 18:0, 16:0 и 18:1. Относительное содержание молекулярных видов алкенильной формы фосфатидилэтаноламинов, имеющих 18:0 в позиции sn1 (18:0_20:4, 18:0_18:2, 18:0_22:6, 18:0_18:1, 18:0_20:5) преобладало относительно других молекулярных видов и

характеризовалось большим спектром разнообразия плазмил ГФЭ. Такая закономерность прослеживалась как в группе контроля, так и среди пациентов с БА.

В обеих группах больных с БА молекулярные виды алкенил ГФЭ, содержащие ацильные группы 20:4 (16:0_20:4, 18:1_20:4, 18:0_20:4) и 18:2 в позиции sn2 (18:0_18:2, 16:0_18:2, 18:1_18:2), преобладали над другими видами ацильных остатков. Суммарное значение относительного содержания молекулярных видов алкенил этаноламинов с ацильным остатком 20:4 составило 27,31% в контрольной группе, 23,40% в группе пациентов с БА и нормальной массой тела и 20,95% в группе пациентов с БА, отягощённой ожирением. Совокупность данного молекулярного вида была ниже на 14% и 23% соответственно в группе пациентов с БА и БА, отягощённой ожирением, по сравнению с группой контроля. Сумма молекулярных видов алкенил ГФЭ, содержащих фрагмент 18:2 в позиции sn2, составила 8,22%, 6,86% и 6,86% в группах контроля, БА и БА, отягощённой ожирением, соответственно.

Обращает на себя внимание снижение суммарного содержания алкил ГФЭ и алкенил ГФЭ в группах пациентов с БА и БА, отягощённой ожирением, на фоне повышенного уровня диацил ГФЭ, что свидетельствует о перераспределении жирных кислот между субклассами ГФЭ и дефиците этерных форм ГФЛ.

Полученные в работе результаты представлены на рисунке 3, который отражает карту (heatmap) распределения всех идентифицированных молекулярных видов ГФЭ у здоровых лиц и пациентов с БА. Фенотип БА, отягощённой ожирением, характеризуется перераспределением жирных кислот между диацильными и этерными субклассами ГФЭ.

Таблица 3. Профиль молекулярных видов алкенил-ацильных фосфатидилэтаноламинов плазмы крови пациентов с бронхиальной астмой

sn1_sn2	Контроль, %	БА при нормальной массе тела, %	БА, отягощённая ожирением, %
P-16:0_18:1	0,99 (0,97–1,02)	0,97 (0,95–1,00)	0,85 (0,76–0,85)
P-16:0_18:2	2,65 (2,12–2,72)	1,68 (1,60–2,01)	2,16 (2,09–2,55)
P-16:0_20:4	8,32 (8,11–9,06)	8,19 (8,02–8,65)	7,99 (7,20–8,15)
P-16:0_22:6	3,21 (3,21–3,95)	3,02 (2,99–3,22)	3,26 (3,25–3,69)
P-18:0_18:1	0,71 (0,65–0,73)	0,68 (0,60–0,80)	0,67 (0,65–0,69)
P-18:0_18:2	3,26 (2,98–3,96)	3,00 (2,85–3,15)	2,68 (2,67–3,18)
P-18:0_20:4	8,27 (7,81–8,78)	*7,15 (6,35–7,21)	*6,21 (5,95–6,58)
P-18:0_20:5	0,65 (0,59–0,74)	0,62 (0,58–0,65)	*0,53 (0,49–0,53)*
P-18:0_22:6	2,35 (2,34–2,89)	2,32 (2,17–2,55)	2,23 (2,09–2,85)
P-18:1_18:2	2,34 (2,05–2,69)	2,14 (1,96–2,54)	1,96 (1,95–2,06)
P-18:1_20:4	9,98 (9,54–10,42)	*8,11 (7,59–8,26)	*6,85 (6,36–6,91)
sum алкенил ГФЭ	42,56 (42,08–45,12)	*38,14 (37,43–38,25)	*35,35 (34,93–35,99)
sum sn2_18:2	8,22 (8,05–8,76)	6,86 (6,59–7,73)	6,86 (6,72–7,55)
sum sn2_20:4	27,31 (26,04–27,44)	*23,40 (22,29–23,73)	*20,95 (19,70–21,78)
sum sn2_22:6	5,97 (5,56–6,45)	5,34 (5,18–5,54)	6,08 (5,34–6,27)

Примечание. Количественные значения представлены в виде медианы (Me) и интерквартильного интервала (Q25–Q75). Относительное содержание каждого молекулярного вида приведено в % от суммы всех молекулярных видов фосфатидилэтаноламинов; sn1 – алкенильный заместитель в первой позиции, sn2 – ацильный заместитель во второй позиции. Звёздочками справа обозначены статистически значимые различия между фенотипами бронхиальной астмы, слева – относительно группы контроля: (*) – $p < 0,017$.

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ВИДЫ ГФЭ ПРИ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЕ С ОЖИРЕНИЕМ

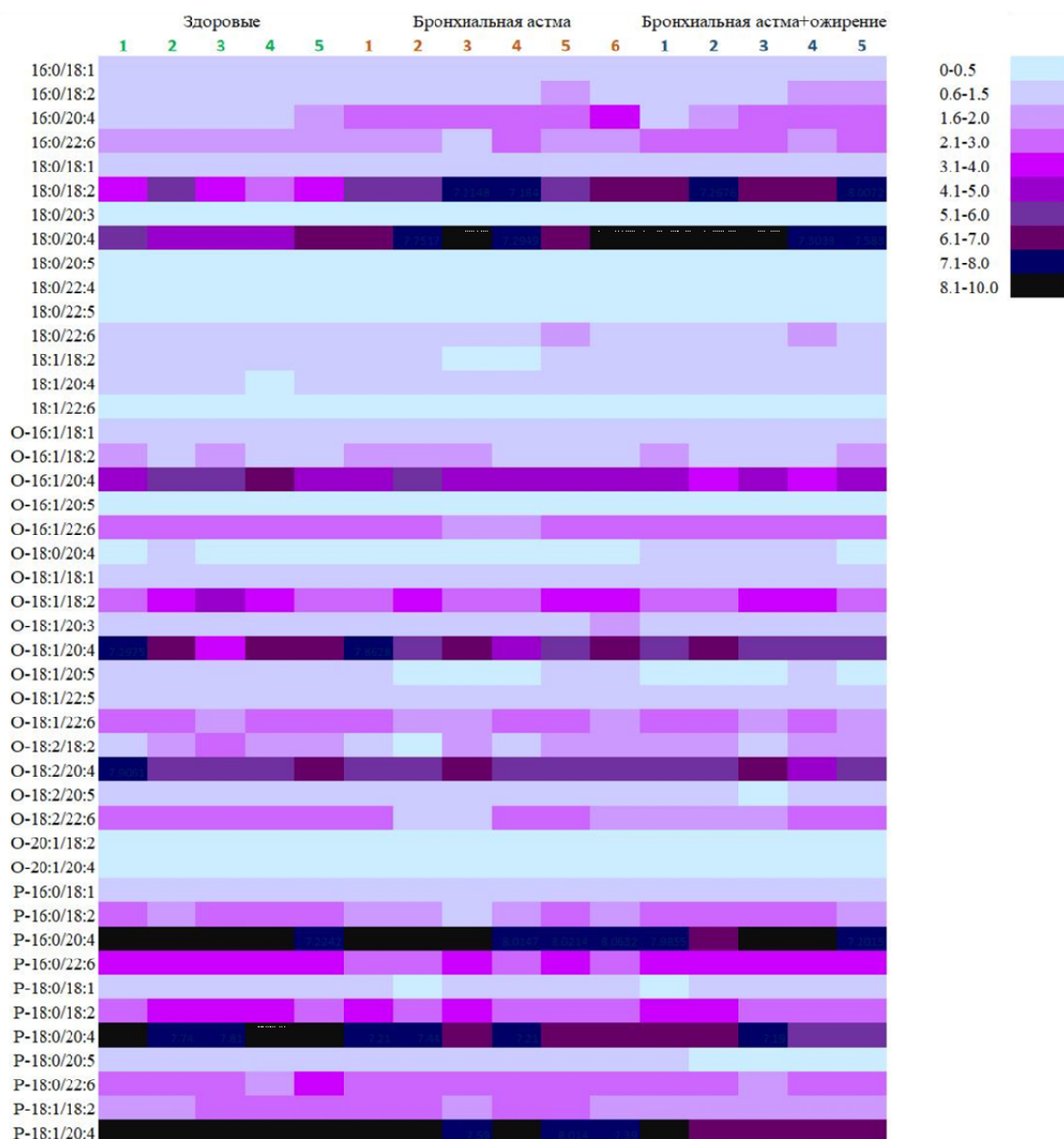


Рисунок 3. Heatmap молекулярных видов ГФЭ плазмы крови пациентов с БА и БА, отягощённой ожирением. Heatmap представляет уровень диацил, алкил-ацил и алкенил-ацил ГФЭ в плазме крови у 5 здоровых добровольцев, 6 пациентов с БА и нормальной массой тела, 5 пациентов с БА и ожирением. Интенсивность цвета показывает процент определённого молекулярного вида у индивидуума.

ОБСУЖДЕНИЕ

В представленном исследовании показано изменение липидного профиля молекулярных видов ГФЭ при фенотипе БА, отягощённой ожирением. При БА, отягощённой ожирением, в значительной степени увеличивается уровень следующих молекулярных видов диацильных форм ГФЭ: 16:0_20:4, 18:0_18:2, 18:0_20:4, 18:1_20:4, 18:0_22:4; а молекулярный состав диацилфосфотаноламинов характеризуется преобладанием ацильных групп 20:4 и 18:2 в позиции sn2. Превалирование эстерификации арахидоновой кислоты (20:4) и её прекурсоров позволяет предположить увеличение синтеза провоспалительных эйкозаноидов, таких как лейкотриены, с участием липоксигеназы (LOX),

что приводит к утяжелению симптомов. Повышенное содержание линолевой кислоты (18:2), являющейся субстратом для 12/15-липоксигеназы (12/15LOX), способствует активному синтезу 13-S-гидроксиоктадекадиеновой кислоты (HODE) — мощного провоспалительного медиатора, вызывающего митохондриальную дисфункцию, нейтрофильное воспаление, провоцирующего тяжёлую обструкцию дыхательных путей [15]. Известно, что повышенное образование HODE способствует нарастанию степени тяжести БА за счёт снижения чувствительности к глюкокортикоидам [15].

Следует отметить, что при значительном увеличении уровня диацил ГФЭ с 20:4, 22:4 и 18:2 ЖК происходит уменьшение данных ЖК в алкильных

и алкенильных молекулярных видах ГФЭ. У пациентов с БА также наблюдается дефицит 18:0_20:5, 18:1_20:5, 18:2_20:5 этерных ГФЭ. ГФЛ с алкенильной связью (плазмалогены) являются важными компонентами клетки, выполняющими функции первичного акцептора свободных радикалов, тем самым препятствуя окислению мембранного бислоя и дальнейшему запуску свободнорадикальных и воспалительных реакций [16, 17]. Установленный дефицит 1-О-алкенил-2-ацил-sn-глицеро-3-фосфоэтанолamines может провоцировать хронизацию воспаления и развитие окислительного стресса при данном коморбидном фенотипе.

Перезэтерификация ЖК между диацил, алкил-ацил и алкенил-ацил ГФЭ при БА способствует формированию нового пула молекулярных видов фосфолипидов и изменению основного баланса ЖК. В физиологических условиях постоянно происходит ремоделирование глицерофосфолипидов в цикле Кеннеди и цикле Лэндса [18, 19]. Реакции цикла Кеннеди регулируют баланс между полярными и нейтральными липидами, между субклассами ГФЛ, в то время как в результате последовательных реакций цикла Лэндса происходит перезэтерификация жирных кислот между фосфолипидами и образование новых молекулярных видов ГФЛ [20].

Молекулярная структура ГФЭ играет решающую роль в сигнальных процессах клетки и функционирования митохондрий, а также в регуляции митохондриальной динамики в целом и биогенеза белков во внешней митохондриальной мембране [21, 22]. ГФЭ — это предшественник для синтеза N-ацилфосфатидилэтанолamina с дальнейшим образованием анандамида (N-арахидоноилэтанолamina). Он является донором этанолaminфосфата при синтезе гликозилфосфатидилинозитоловых якорей, которые прикрепляют многие сигнальные белки к поверхности плазматической мембраны [23, 24]. Помимо этого, ГФЭ представляет собой важный субстрат для фермента печени — фосфатидилэтанолamin-N-метилтрансферазы, обеспечивающей образование около трети фосфатидилхолина в печени. Выявленная в нашем исследовании трансформация основного состава молекулярных видов ГФЛ может быть следствием перестройки либо нарушения ферментативных реакций метаболизма ГФЛ в основных циклах синтеза упомянутых выше, что провоцирует изменение липидома плазмы крови.

Таким образом, модификацию основного состава и химической структуры молекулярных видов ГФЭ можно рассматривать как один из механизмов нарушения метаболизма липидов, процессов окисления и регуляции иммунных реакций при БА. Дальнейшее исследование молекулярных видов ГФЭ на большей выборке, а также изучение активности основных ферментов синтеза и ремоделирования фосфолипидов позволит раскрыть роль индивидуальных субклассов фосфолипидов и их молекулярных видов в патогенетических механизмах развития фенотипа БА, отягощённого ожирением.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Исследование проведено за счёт средств федерального бюджета Российской Федерации.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием людей, соответствовали этическим стандартам институционального и/или национального исследовательского комитета, а также Хельсинкской декларации 1964 года и более поздним поправкам к ней или сопоставимым этическим стандартам. Исследование проведено в соответствии с требованиями Хельсинкской Декларации Всемирной медицинской ассоциации (2013 г.) с одобрения Локального этического комитета (протокол № 2/2021 от 19.01.2021 г.). У пациентов и добровольцев было получено информированное согласие на проведение данного исследования.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Nelson D.L., Cox M.M. (2008) *Lehninger Principles of Biochemistry*. 5th Edition, W.H. Freeman Macmillan, New York.
2. Denisenko Y.K., Kytikova O.Y., Novgorodtseva T.P., Antonyuk M.V., Gvozdenko T.A., Kantur T.A. (2020) Lipid-induced mechanisms of metabolic syndrome. *J. Obesity*, **2020**, 5762395. DOI: 10.1155/2020/5762395
3. Liebisch G., Fahy E., Aoki J., Dennis E.A., Durand T., Ejsing C.S., Fedorova M., Feussner I., Griffiths W.J., Köfeler H., Merrill A.H. Jr, Murphy R.C., O'Donnell V.B., Oskolkova O., Subramaniam S., Wakelam M.J.O., Spener F. (2020) Update on LIPID MAPS classification, nomenclature, and shorthand notation for MS-derived lipid structures. *J. Lipid Res.*, **61**(12), 1539-1555. DOI: 10.1194/JLR.S120001025
4. Farine L., Niemann M., Schneider A., Büttikofer P. (2015) Phosphatidylethanolamine and phosphatidylcholine biosynthesis by the Kennedy pathway occurs at different sites in *Trypanosoma brucei*. *Sci. Rep.*, **5**(1), 16787. DOI: 10.1038/SREP16787
5. Patel D., Witt S.N. (2017) Ethanolamine and phosphatidylethanolamine: Partners in health and disease. *Oxid. Med. Cell. Longev.*, **2017**, 4829180. DOI: 10.1155/2017/4829180
6. Calzada E., Onguka O., Claypool S.M. (2016) Phosphatidylethanolamine metabolism in health and disease. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.*, **321**, 29-88. DOI: 10.1016/BS.IRCMB.2015.10.001
7. Kytikova O., Novgorodtseva T., Denisenko Y., Antonyuk M., Gvozdenko T. (2019) Pro-resolving lipid mediators in the pathophysiology of asthma. *Medicina* (Kaunas, Lithuania), **55**(6), 284. DOI: 10.3390/MEDICINA55060284
8. Bozelli J.C. Jr, Azher S., Epan R.M. (2021) Plasmalogens and chronic inflammatory diseases. *Front. Physiol.*, **12**, 730829. DOI: 10.3389/FPHYS.2021.730829

9. *Hatton S.L., Pandey M.K.* (2022) Fat and protein combat triggers immunological weapons of innate and adaptive immune systems to launch neuroinflammation in Parkinson's disease. *Int. J. Mol. Sci.*, **23**(3), 1089. DOI: 10.3390/IJMS23031089
10. *Valentine W.J., Hashidate-Yoshida T., Yamamoto S., Shindou H.* (2020) Biosynthetic enzymes of membrane glycerophospholipid diversity as therapeutic targets for drug development. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **1274**, 5-27. DOI: 10.1007/978-3-030-50621-6_2
11. *Bligh E.G., Dyer W.J.* (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.*, **37**(8), 911-917. DOI: 10.1139/O59-099
12. *Carreau J.P., Dubacq J.P.* (1978) Adaptation of a macro-scale method to the micro-scale for fatty acid methyl transesterification of biological lipid extracts. *J. Chromatography A*, **151**(3), 384-390. DOI: 10.1016/S0021-9673(00)88356-9
13. *Christie W.W.* (1988) Equivalent chain-lengths of methyl ester derivatives of fatty acids on gas chromatography: A reappraisal. *J. Chromatography A*, **447**, 305-314. DOI: 10.1016/0021-9673(88)90040-4
14. *Imbs A.B., Dang L.P., Rybin V.G., Svetashev V.I.* (2015) Fatty acid, lipid class, and phospholipid molecular species composition of the soft coral *Xenia* sp.(Nha Trang Bay, the South China Sea, Vietnam). *Lipids*, **50**, 575-589. DOI: 10.1007/s11745-015-4021-0
15. *Panda L., Gheware A., Rehman R., Yadav M.K., Jayaraj B.S., Madhunapantula S.V., Mahesh P.A., Ghosh B., Agrawal A., Mabalirajan U.* (2017) Linoleic acid metabolite leads to steroid resistant asthma features partially through NF-κB. *Sci. Rep.*, **7**(1), 9565. DOI: 10.1038/S41598-017-09869-9
16. *Almsheqi Z.A.* (2021) Potential role of plasmalogens in the modulation of biomembrane morphology. *Front. Cell Dev. Biol.*, **9**, 673917. DOI: 10.3389/FCELL.2021.673917
17. *Astudillo A.M., Balboa M.A., Balsinde J.* (2022) Compartmentalized regulation of lipid signaling in oxidative stress and inflammation: Plasmalogens, oxidized lipids and ferroptosis as new paradigms of bioactive lipid research. *Prog. Lipid. Res.*, **89**, 101207. DOI: 10.1016/j.plipres.2022.101207
18. *Gibellini F., Smith T.K.* (2010) The Kennedy pathway — *de novo* synthesis of phosphatidylethanolamine and phosphatidylcholine. *IUBMB Life*, **62**(6), 414-428. DOI: 10.1002/IUB.337
19. *O'Donnell V.B.* (2022) New appreciation for an old pathway: The Lands cycle moves into new arenas in health and disease. *Biochem. Soc. Trans.*, **50**(1), 1-11. DOI: 10.1042/BST20210579
20. *Moessinger C., Klizaite K., Steinhagen A., Philippou-Massier J., Shevchenko A., Hoch M., Ejsing C.S., Thiele C.* (2014) Two different pathways of phosphatidylcholine synthesis, the Kennedy Pathway and the Lands Cycle, differentially regulate cellular triacylglycerol storage. *BMC Cell Biology*, **15**(1), 1-17. DOI: 10.1186/S12860-014-0043-3
21. *Annibal A., Riemer T., Jovanovic O., Westphal D., Griesser E., Pohl E.E., Schiller J., Hoffmann R., Fedorova M.* (2016) Structural, biological and biophysical properties of glycated and glycoxidized phosphatidylethanolamines. *Free Rad. Biol. Med.*, **95**, 293-307. DOI: 10.1016/J.FREERADBIOMED.2016.03.011
22. *Basu Ball W., Neff J.K., Gohil V.M.* (2018) The role of nonbilayer phospholipids in mitochondrial structure and function. *FEBS Lett.*, **592**(8), 1273-1290. DOI: 10.1002/1873-3468.12887
23. *Денисенко Ю.К., Бочарова Н.В., Коваленко И.С., Новгородцева Т.П.* (2022) Влияние N-ацил-этанолamina арахидоновой кислоты на синтез цитокинов и оксилипинов лейкоцитами крови пациентов с бронхиальной астмой в условиях *in vitro*. *Бюллетень физиологии и патологии дыхания*, **83**, 15-21. [Denisenko Yu.K., Bocharova N.V., Kovalenko I.S., Novgorodtseva T.P. (2022) Influence of N-acyl-ethanolamine of arachidonic acid on the synthesis of cytokines and oxylipins by the blood leukocytes of patients with asthma under *in vitro* conditions. *Bulletin of Physiology and Pathology of Respiration*, **83**, 15-21.] DOI: 10.36604/1998-5029-2022-83-15-21
24. *Dawaliby R., Trubbia C., Delporte C., Noyon C., Ruysschaert J.M., van Antwerpen P., Govaerts C.* (2016) Phosphatidylethanolamine is a key regulator of membrane fluidity in eukaryotic cells. *J. Biol. Chem.*, **291**(7), 3658-3667. DOI: 10.1074/JBC.M115.706523

Поступила в редакцию: 13. 02. 2023.
После доработки: 11. 04. 2023.
Принята к печати: 26. 04. 2023.

THE LIPIDOME ANALYSIS OF MOLECULAR SPECIES
OF GLYCEROPHOSPHATIDYLETHANOLAMINES IN PATIENTS
WITH BRONCHIAL ASTHMA COMPLICATED BY OBESITY

Yu.K. Denisenko¹, U.M. Omatova^{1*}, T.P. Novgorodtseva¹, E.V. Ermolenko²

¹Vladivostok Branch of Far Eastern Scientific Center of Physiology and Pathology of Respiration —
Institute of Medical Climatology and Rehabilitative Treatment,

73g Russkaya str., Vladivostok, 690105 Russia; *e-mail: omatova.um@inbox.ru

²A.V. Zhirmunsky National Scientific Center of Marine Biology Far Eastern Branch, Russian Academy of Sciences,
17 Palchevskogo str., Vladivostok, 690041 Russia

Bronchial asthma (BA) complicated by obesity is a progressive disease phenotype that hardly responds to standard therapy. In this regard, it is important to elucidate cellular and molecular mechanisms of development of this comorbid pathology. In recent years, lipidomics has become an active research tool, opening new opportunities not only for understanding cellular processes in health and disease, but also for providing a personalized approach to medicine. The aim of this study was to characterize the lipidome phenotype based on the study of molecular species of glycerophosphatidylethanolamines (GPEs) in blood plasma of patients with BA complicated by obesity. Molecular species of GPEs were studied in blood samples of 11 patients. Identification and quantification of GPEs was carried out using high resolution tandem mass spectrometry. For the first time in this pathology, a change in the lipidome profile of molecular species of diacyl, alkyl-acyl and alkenyl-acyl GPEs of blood plasma was shown. In BA complicated by obesity, acyl groups 18:2 and 20:4 were dominated in the sn2 position of the molecular composition of diacylphosphoethanolamines. Simultaneously with the increase in the level of GPE diacyls with the fatty acids (FA) 20:4, 22:4, and 18:2, there was a decrease in these FAs in alkyl and alkenyl molecular species of GPEs, thus indicating their redistribution between subclasses. The eicosapentaenoic acid (20:5) deficiency at the sn2 position of alkenyl GPEs in patients with BA complicated by obesity indicates a decrease in the substrate for the synthesis of anti-inflammatory mediators. The resulting imbalance in the distribution of GPE subclasses, due to a pronounced increase in the content of diacyl GPE under conditions of the deficiency of molecular species of ether forms, can probably cause chronic inflammation and the development of oxidative stress. The recognized lipidome profile characterized by the modification of the basic composition and the chemical structure of GPE molecular species in BA complicated by obesity indicates their involvement in the pathogenetic mechanisms underlying BA development. The elucidation of particular roles of individual subclasses of glycerophospholipids and their individual members may contribute to the identification of new therapeutic targets and biomarkers of bronchopulmonary pathology.

The whole English version is available at <http://pbmc.ibmc.msk.ru>.

Key words: glycerophosphatidylethanolamines; ether lipids; bronchial asthma; obesity; chronic respiratory diseases; plasma

Funding. The study was performed using the Federal Budget Funds of the Russian Federation.

Received: 13.02.2023; revised: 11.04.2023; accepted: 26.04.2023.